

#5

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 02 APR 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

102 00 717.9

**Anmeldetag:**

10. Januar 2002

**Anmelder/Inhaber:**

Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.,  
Jena/DE;  
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena/DE.

**Bezeichnung:**

Verwendung von Polysaccharid-Derivaten als anti-  
infektive Substanzen

**IPC:**

A 61 K, C 08 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Februar 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Weihmayer

## **Verwendung von Polysaccharid-Derivaten als antiinfektive Substanzen**

### **Zusammenfassung**

Polysaccharide, wie Polyglucane und chemisch oder enzymatisch partiell hydrolysierte Stärken, die mit über Linker gebundenen quaternären Ammoniumgruppen mit einem Substitutionsgrad von 0,4 bis 3,0 substituiert sind, sind als antiinfektive Mittel bzw. für die Behandlung von Infektionserkrankungen, hervorgerufen durch Viren und Bakterien, geeignet.

## Ansprüche

1. Verwendung von Polysacchariden, die mit über Linker gebundenen quaternären Ammoniumgruppen bei einem Substitutionsgrad von 0,4 bis 3,0 substituiert sind, zur Behandlung von Infektionserkrankungen.
2. Verwendung von Polysacchariden gemäß Anspruch 1, wobei der Substitutionsgrad 0,6 bis 1,8 beträgt.
3. Verwendung von Polysacchariden gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei den Polysacchariden um Polyglucane wie Cellulose, Lichenan, Pullulan, Dextran und Stärke handelt.
4. Verwendung von Polysacchariden gemäß Anspruch 3, wobei es sich bei den Polysacchariden um Stärken wie Kartoffel-, Weizen-, Mais- und Reisstärke, chemisch oder enzymatisch partiell hydrolysierte Stärke oder aus gentechnisch veränderten Pflanzen gewonnene Stärke handelt.
5. Verwendung von Polysacchariden gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei den Linkern, über die die quaternären Ammoniumgruppen an die Polysaccharide gebunden sind, um gegebenenfalls durch Hydroxy substituiertes C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Äthylen-Gruppen handelt.
6. Verwendung von Polysacchariden gemäß Anspruch 1 zur Behandlung von viralen und bakteriellen Infektionserkrankungen.

## Verwendung von Polysaccharid-Derivaten als antiinfektive Substanzen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Substanzen auf der Basis von Oligo- und Polysacchariden als antiinfektive, wie antibakterielle und antivirale Mittel. Diese antiinfektiven Mittel können beispielsweise in kosmetischen und pharmazeutischen Formulierungen als Konservierungsstoffe, als biologische aktive Verbindung in Arzneimittelzubereitungen, zur biociden Ausrüstung von Oberflächen, von Geweben, und von Verpackungsmaterialien für beispielsweise Lebensmittel oder Produkte, die in der Medizin, Biologie, Pharmazie Verwendung finden, und für die Wundabdeckung zur Anwendung in der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie, der Landwirtschaft und der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie genutzt werden.

Es ist bekannt, dass global die Infektionen mit bakteriellen Krankheitserregern zunehmen und dabei die antibakterielle Resistenz ein generelles Gesundheitsproblem ist. Ein weltweiter Zuwachs an Tuberkuloseinfektionen mit Mykobakterienstämmen, die im Verlauf der Zeit resistent gegenüber den gewöhnlichen Therapeutika geworden sind (B.R.Bloom, J.L.Murray, Science **257**, 1992, 1055), sowie die Therapie von Infektionen mit multiresistenten Staphylokokken (M. Kresken, Bundesgesundheitsblatt **38**, 1996, 170), erfordert das Design von neuen Wirksubstanzen. Alternative Wirkstoffe mit neuen Wirkmechanismen, insbesondere zur Entgegenwirkung der Antibiotikaresistenz und zur Bekämpfung bakterieller Infektionen bei Unverträglichkeiten gegenüber vorhandenen Wirkstoffen sind dringend notwendig.

Mit der Entwicklung hochselektiver Nukleosid- und Nukleotidvirustatika wie z. B. Acyclovir, Penciclovir, Ganciclovir, Sorivudine und Cidofovir für Herpesviren wurde zwar ein bedeutender Fortschritt bei der Bekämpfung lebensbedrohlicher Infektionen erreicht, doch die genannten Therapeutika besitzen alle das gleiche Wirkprinzip. Sie hemmen die virale DNA-Polymerase. Ein weiterer Nachteil dieser Verbindungen besteht darin, dass sie auch in den DNA-Stoffwechsel der infizierten Zelle eingreifen und deshalb die Gefahr in sich bergen, mutagene, teratogene und onkogene Wirkungen hervorzurufen (Wutzler, P. Thust, R. Antiv. Res. **49**, 2001, 55). Außerdem wurden bei Langzeitanwendung von Nukleosid- und Nukleotidvirustatika sowohl in infizierten Zellkulturen als auch bei

immunsupprimierten Patienten Resistenzentwicklungen gegenüber diesen Medikamenten nachgewiesen (Andrei, G. et al. Antimicrob. Agents Chemother., 1995, 39 1632; Pavic, I. et al. Antimicrob. Agents Chemother., 1997, 39 2686). Deshalb müssen zusätzlich neue hochwirksame antivirale Prophylaktika und Therapeutika mit einem anderen Wirkmechanismus entwickelt werden.

Quartäre Ammoniumverbindungen gehören zur großen Gruppe der biologisch wirksamen Substanzen. Sie sind in der Lage, Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze zu vernichten. Niedermolekulare quartäre Ammoniumsalze werden als Desinfektionsmittel oder biocides Beschichtungsmaterial eingesetzt (J. Controlled Release 50, 1998, 145). Ein typisches Problem der niedermolekularen Verbindungen ist eine unzureichende Bioverfügbarkeit beispielsweise hervorgerufen durch verschiedene Transport- und Abbauvorgänge. Polymere quartäre Aminfunktionalisierte Materialien können aus kommerziellen quartären Austauschharzen, durch Graftpolymerisation von Polyurethanen mit Hydroxytelechelen des Polybutadienes oder aus Polysiloxanen mit primären Alkoholfunktionen in der Seitenkette synthetisiert werden. Diese biociden Polymere haben meist hohe Produktionskosten und sind häufig toxisch, da Reste der toxischen Monomere enthalten sind (Trends in Polymer Science 4, 1996, 364). Darüber hinaus kann es zu unerwünschten und gefährlichen Akkumulationen der Polymere im Organismus kommen, da sie nicht biologisch abbaubar sind. Des weiteren werden synthetische Polymere, die kationische Funktionen enthalten, als Dispersionen für den Holzschutz verwendet (US 5,049,383). Nachteil der synthetischen Polymere, die kationische Funktionen enthalten, sind die hohen Herstellungskosten, die Toxizität (Verunreinigung durch Restmonomergehalt) und die Stabilität gegenüber biologischem Abbau.

Polysaccharidderivate mit quartären Ammoniumfunktionen sind bekannt und werden bisher vor allem als Zusatzstoff zur Oberflächenvergütung für die Papier- und Textilindustrie sowie in der Kosmetik als Konsistenzregler eingesetzt, wobei sie nur einen geringen Substitutionsgrad (DS) < 0,2 aufweisen. Über die biologischen Wirkungen ist bisher nichts bekannt geworden. Demgegenüber werden antiinfektive Wirkungen, speziell antibakterielle Wirkungen von

Stärkeethern beschrieben, die lange Alkylketten ( $C_8$ - $C_{22}$ ) enthalten und an die Stärke über Silylethergruppen gebunden sind (JP 05295002). Die geringe chemische Stabilität der Alkylsilylether von Polysacchariden führt zu einer unkontrollierten Freisetzung von funktionellen Gruppen sogar schon durch die  
5 Einwirkung von Luftfeuchtigkeit und damit zur Verringerung oder zum Verlust der biologischen Aktivität (D. Klemm et.al., Comprehensive Cellulose Chemistry, Wiley-VCH, 1998). Darüber hinaus sind niedermolekulare Silylverbindungen toxisch. Ansonsten beziehen sich Veröffentlichungen auf antibakteriell wirksame Cellulosefasern und Chitosanderivate (W. H. Daly, M. M. Guerrini, Polym. Mat.  
10 Sci. Eng. **79**, 1998, 220). Chitosan wird als natürliches kationisches Polysaccharid am häufigsten beschrieben und als fungizides Mittel in der Kosmetik eingesetzt (T. Tashiro, Macromol. Mater. Eng. **286**, 2001, 63, K.C. Gupta, M.N.V.R. Kumar, J.M.S.-Rev. Macromol. Chem. Phys. **C40**, 2000, 273). Nachteile dieser Polysaccharide sind häufig die Verunreinigungen mit anderen  
15 biogenen Substanzen, der hohe Preis aufgrund der aufwendigen Isolierungs- und Reinigungsmethoden und die naturgegebene Struktur, die Ammoniumgruppen sind ausschließlich am Polymerrückgrat lokalisiert. Darüber hinaus ist deren Verteilung nicht steuerbar und der Gehalt ist auf einen Substitutionsgrad von 1 beschränkt. Superabsorber aus kationisch modifizierten und vernetzten Polysacchariden wie der Cellulose (EP 0 582 624 B1) wurden ebenfalls beschrieben.

Es existieren Angaben in der Literatur, dass die biologische Aktivität aus dem Vorhandensein der quartären Ammoniumfunktionen resultiert, wobei andererseits beschrieben wird, dass bei typischen Verbindungen mit  
25 kationischen Tetraalkylstickstoffgruppen wie Polyquaternium 10 nachweislich keine Bioaktivität vorliegt (W.A. Daly, M.M. Guerrini, D. Culberson, J. Macossay, in: Science and Technology of Polymers and Advanced Materials, Plenum Press, 1998, 493). Es lässt sich aus den vorliegenden Literaturergebnissen keineswegs schlussfolgern, ob und welche Strukturen tatsächlich biologisch wirksam sind.

30.

A Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Polymere mit neuartiger antiinfektiver Wirksamkeit aufzufinden; die Substanzen sollen eine hohe antiinfektive Wirkung in einem breiten Spektrum besitzen, eine effektive Bekämpfung von

Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionen gestatten, neue Möglichkeiten zur Therapie von viralen Infektionen bieten, sowie gut verträglich, biologisch abbaubar, nicht toxisch und in einfacher Art herstellbar sind.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Polysaccharidderivaten gelöst, bei denen durch Veretherungsreaktionen kationische Funktionen mit einem Substitutionsgrad (DS) im Bereich von 0,4 bis 3,0, insbesondere Alkylammoniumgruppierungen mit einem DS im Bereich von 0,6 bis 1,8 über Spacergruppen in Polysaccharide eingeführt wurden. Polysaccharide sind aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit und Nichttoxizität besonders geeignet.

Die Erfindung betrifft demgemäß die Verwendung von Polysacchariden, die mit über Linker gebundenen quaternären Ammoniumgruppen mit einem Substitutionsgrad von 0,4 bis 3,0 substituiert sind, als antiinfektive Mittel bzw. zur Behandlung von Infektionserkrankungen.

Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen weisen eine hohe biologische Aktivität auf und hemmen überraschenderweise das Wachstum pathogener Bakterien, wie z.B. Staphylokokken und Mycobakterien mit minimalen Hemmkonzentrationen im Bereich von 5 - 60 mg/L sowie die Vermehrung von Herpes- und Influenzaviren in einem Bereich von 3-50 mg/L. Die Verbindungen können auf Grund dieser Eigenschaften zur Herstellung von Arzneimitteln zur Vorbeugung und Bekämpfung bakterieller und viraler Infektionen dienen. Sie können sowohl allein als auch in Kombination mit bekannten Therapeutika oder mit physiologisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen angewandt werden.

Die antiinfektiven Verbindungen können zur Verwendung als Lösung oder Suspension in pharmazeutisch akzeptablen Medien für eine topische oder parenterale Applikation, über intravenöse, subcutane oder intramuskuläre Injektionen, für intranasale Applikation; als Tablette, Kapsel oder Suppositorium zubereitet werden. Die Verbindungen können in Dosierungen von 0,1 - 1000 mg/kg Körpergewicht eingesetzt werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen wirksamen Verbindungen werden Polysaccharide, bevorzugt Polyglucane wie Cellulose, Lichénan, Pullulan, Dextran und besonders bevorzugt Stärken wie native Stärken unterschiedlicher Provenienz, beispielsweise Kartoffel-, Weizen-, Mais- und Reisstärke, und chemisch oder enzymatisch partiell hydrolysierte Stärken wie Solamyl, Amylose, Amylopektin und Wachsmaisstärke sowie aus gentechnisch veränderten Pflanzen gewonnene Stärken wie die Hylon-Typen eingesetzt. Der Gehalt an Amylose in den Stärken kann ebenso wie der an Amylopektin jeweils von 0-100%, bevorzugt von 30-70%, betragen. Die Molekulargewichte geeigneter Polysaccharide liegen im Bereich von  $10^3$ - $10^7$ g/mol (vgl. Tab. 1). Die Anhydroglucoseeinheit-Wiederholungseinheiten (AGU) können über  $\alpha(1-4)$ ,  $\alpha(1-6)$ ,  $\alpha(1-3)$ ,  $\beta(1-4)$  und  $\beta(1-3)$  Bindungen oder auch Kombinationen davon wie beispielsweise  $\alpha(1-4)$  und  $\alpha(1-6)$ , wie in Abb. 1 schematisch gezeigt, oder  $\alpha(1-6)$ ,  $\alpha(1-3)$  und  $\alpha(1-4)$  miteinander verknüpft sein und unterschiedlich lange und verknüpfte Seitenketten enthalten. Darüber hinaus können auch weitere funktionelle Gruppen wie Phosphatesterfunktionen beispielsweise bei der natürlichen Kartoffelstärke enthalten sein.

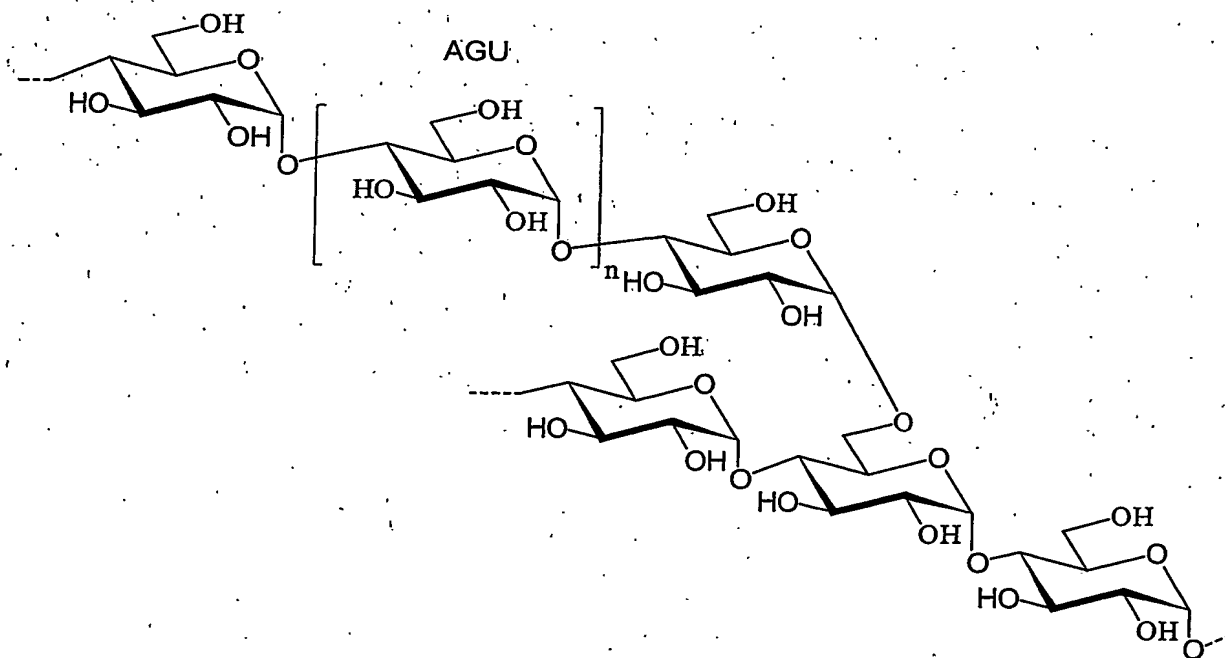


Abb. 1 Strukturbeispiel der einsetzbaren Polysaccharide



Tab. 1:

Stärkematerial	Amylosegehalt (%)	Molekulargewicht (GPC <sup>1</sup> ) (g · mol <sup>-1</sup> )
Hylon VII (H)	70	9 · 10 <sup>6</sup>
Kartoffelstärke (P, Emsland)	28	40 · 10 <sup>6</sup>
Maisstärke (M)	28	76 · 10 <sup>6</sup>
Weizenstärke (W)	26	65 · 10 <sup>6</sup>
Wachsmaisstärke (WM)	1	51 · 10 <sup>6</sup>
Solamyl (S)	28	9700

<sup>1</sup>bestimmt in DMSO

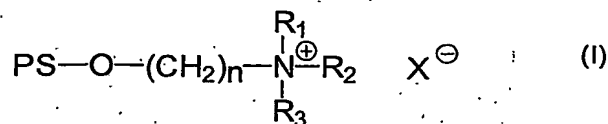
Das Ausmaß der Umsetzung an den Hydroxylgruppen wird durch den durchschnittlichen Substitutionsgrad (DS) beschrieben. Dieser Durchschnittswert gibt ohne jede Differenzierung die Anzahl der funktionalisierten Hydroxylgruppen an und liegt demnach bei den genannten Polysacchariden definitionsgemäß im Bereich von 0 bis 3. Der DS an kationischen Gruppen der antiinfektiv wirksamen Polysaccharidderivate der Erfindung liegt zwischen 0,4 und 3,0, bevorzugt zwischen 0,6 und 1,8. Werden bei Derivatisierungen funktionelle Gruppen eingeführt, die selbst reaktive Gruppierungen enthalten, z.B. Hydroxylgruppen als Ergebnis der Veretherung von Polysacchariden mit Epoxiden, können diese unter Ausbildung von längeren Seitenketten ebenfalls reagieren.

Die erfindungsgemäß verwendbaren Polysaccharidderivate sind bekannt oder können in an sich bekannter Weise gewonnen werden, insbesondere durch Veretherung von Polysacchariden mit reaktiven Verbindungen, wodurch entweder direkt quartäre Ammoniumverbindungen der allgemeinen Formel (I) (PS: Polysaccharid-Rest, nur ein Substituent gezeigt) gebildet werden oder wobei die Quaternisierung im Anschluss an die Veretherungsreaktion erfolgt. In Formel (I) bedeutet R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> unabhängig voneinander vorzugsweise Alkyl mit 1-4 C Atomen oder Benzyl oder substituiertes Benzyl (Substituenten sind z.B. 1 bis 3 Alkyl, Halogen, Alkoxy, Carbamoyl, Alkoxycarbonyl, Cyano, Dialkylamino), R<sub>1</sub> auch Wasserstoff, X ein Anion (z.B. Halogenid, Hydroxid,

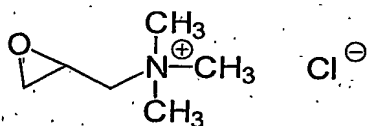
14

7

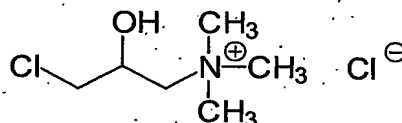
Sulfat, Hydrogensulfat und ein anderes Anion von Mineral- und Carbonsäuren),  
n 2-4 sein kann.



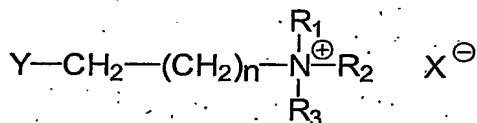
Bevorzugt verwendete quartäre Kationisierungsreagenzien sind das 2,3-Epoxypropyltrimethylammoniumchlorid (QUAB®151, Degussa AG, Formel II) oder das 3-Chloro-2-hydroxypropyltrimethylammoniumchlorid (QUAB®188, Degussa AG, Formel III). Es lassen sich auch Reagenzien der allgemeinen Formel IV mit Y = Cl, Br und n = 1-3 zur Veretherung der Polysaccharide heranziehen.



(II)



(III)



(IV)

Demgemäß handelt es sich bei dem Linker, über den die quaternären Ammoniumgruppen an die Polysaccharide gebunden sind, um gegebenenfalls durch Hydroxy substituiertes C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylen.

Die Veretherung zur Herstellung der biologisch aktiven Polysaccharidderivate kann in unterschiedlicher Weise durchgeführt werden und erfolgt in an sich bekannter Weise, wobei hohe Gehalte an den kationischen Gruppen realisiert werden. Sowohl Suspensionen der Polymere in einem Alkohol und Natronlauge und Wasser (heterogenes Verfahren), wobei Alkohole wie Methanol, Isopropanol und bevorzugt Ethanol, oder wässrigen Alkalilauge, bevorzugt Natronlauge/Wasser mit einem Übergang vom heterogenen zum homogenen System als auch homogene Lösungen der Polymere in dipolar-aprotischen

Lösemitteln wie Dimethylsulfoxid oder Dimethylacetamid in Gegenwart von Lithiumchlorid oder weiteren Lösemitteln als Reaktionsmedien geeignet sind. Die Reaktionszeit für die Umsetzung mit dem Kationisierungsreagenz liegt zwischen 1 und 48 h, bevorzugt bei 3 bis 24 h, und die Temperatur zwischen 30 und 130°C, bevorzugt bei 40 bis 80°C. Durch die eingesetzten Moläquivalente des Veretherungsmittels kann zusätzlich der Substitutionsgrad der Produkte eingestellt und in weiten Grenzen variiert werden. Darüber hinaus sind auch Mehrstufenreaktionen für die Gewinnung der Polysaccharidderivate geeignet, wobei ein bereits kationisiertes oder aminofunktionalisiertes Produkt erneut unter den oben genannten Bedingungen umgesetzt wird. Die Aufarbeitung der Reaktionsprodukte erfolgt mit üblichen Verfahren der Polymerchemie, wobei die niedermolekularen Nebenprodukte und Reagenzreste durch Dialyse oder Waschprozesse oder Umfällen aus Wasser in organische Lösemittel abgetrennt werden.

Die Substitutionsgrade werden mittels Elementaranalyse ermittelten Stickstoffwerten nach folgender Bestimmungsformel berechnet:

$$DS_N = \frac{162,15 \cdot \%N}{1401 - 151,64 \cdot \%N}$$

Darüber hinaus eignen sich die in den Verbindungen enthaltenen Gegenionen wie Chlorid und die NMR-Spektren zur Bestimmung der DS-Werte.

Die folgenden Ausführungsbeispiele sollen die Erfindung näher erläutern, jedoch in keiner Weise einschränken.

#### Ausführungsbeispiele:

##### 1. Herstellung der Verbindungen durch heterogene Reaktionsführung in Ethanol/Natronlauge/Wasser

20 g Polysaccharid (Art des Polysaccharides, siehe folgende Tabelle 2) werden in 80 ml Ethanol suspendiert. Zu dieser Suspension wird eine Lösung von 10,85 g NaOH in 28 ml Wasser und 80 ml Ethanol sowie eine Lösung von 0,246 mol QUAB®188 (69% wässrige Lösung) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 6

h bei 60°C gerührt. Das Produkt wird mit 0,1 n HCl neutralisiert, dialysiert und gefriergetrocknet.

Die Ausbeute beträgt 95 % (bezogen auf den erreichten DS).

Elementaranalyse: N % 3,51

5 Durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS<sub>N</sub>) = 0,66

Tab. 2: Heterogene Kationisierung

Polysaccharid	Reagenz		Substitutionsgrad	
	Typ	Molverhältnis AGU : Reagenz	Produkt	
Hylon	QUAB®188	1 : 3	H 1 (466)	0,50
Hylon	QUAB®188	1 : 2	H 2 (KS005)	0,66
Amioca	QUAB®188	1 : 3	WM 1 (505)	0,14
Kartoffelstärke	QUAB®188	1 : 3	P 1 <sup>1</sup> (491)	0,34
Kartoffelstärke	QUAB®188	1 : 3	P 2 <sup>1</sup> (469)	0,58
Weizenstärke	QUAB®188	1 : 3,25	W 1 (527)	0,99
Weizenstärke	QUAB®188	1 : 2	W 3 (571)	0,61
Weizenstärke	<sup>2</sup>	1 : 5	W 4	0,72
Weizenstärke	<sup>2</sup>	1 : 10	W 5	0,81

<sup>1</sup> unterschiedliche NaOH-Konzentration

10 <sup>2</sup> Reagenz: Cl-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)H<sub>2</sub>Cl

## 2. Umsetzung von Polysacchariden in wässriger Natronlauge

15 20 g Polysaccharid (Art des Polysaccharides, siehe folgende Tabelle 3) werden in einer NatronlaugeLösung (0,5 g NaOH in 100 ml Wasser) suspendiert. Das Gemisch wird für eine Stunde bei 60°C gerührt. Bei dieser Temperatur werden 0,123 mol QUAB®151 bzw. im Fall der abgebauten Stärke Solamyl wird QUAB® 188 zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 6 h bei 60°C gerührt. Nach

Abkühlung auf Raumtemperatur wird das Gemisch mit 0,1 n HCl neutralisiert; anschließend dialysiert und gefriergetrocknet.

Die Ausbeute beträgt 98% (bezogen auf den erreichten DS).

Elementaranalyse: N % 3,34

5 Durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS<sub>N</sub>) = 0,60

Tab. 3: Hetero-/homogene Kationisierung

Reagenz				Substitutionsgrad
Polysaccharid	Typ	Molverhältnis	Produkt	
AGU : Reagenz				
Hylon	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	H 3 (477)	0,40
Hylon	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 2	H 4 (KS006)	0,92
Amioca	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 0,5	WM 2 (503)	0,38
Amioca	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	WM 3 (501)	0,60
Amioca	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 2	WM 4 (502)	0,92
Maisstärke	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 0,5	M 1 (517)	0,35
Maisstärke	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	M 2 <sup>1</sup> (516)	0,55
Maisstärke	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	M 3 <sup>1</sup> (519)	0,72
Maisstärke	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 2	M 4 (515)	1,03
Kartoffel	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 3	P 3 (KS 016)	0,69
Kartoffel	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 2	P 4 (KS 013)	1,05
Weizenstärke	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 0,5	W 4 (520)	0,39
Solamyl	QUAB <sup>®</sup> 188	1 : 2	S 1 <sup>1</sup> (554)	0,68
Solamyl	QUAB <sup>®</sup> 188	1 : 3	S 2 (555)	0,76
Solamyl	QUAB <sup>®</sup> 188	1 : 2	S 3 <sup>1</sup> (568)	0,80

<sup>1</sup> unterschiedliche NaOH-Konzentration

10

### 3. Homogene Reaktionsführung in Dimethylsulfoxid (DMSO)

15 g Polysaccharid (Art des Polysaccharides, siehe folgende Tabelle 4) werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) bei Raumtemperatur suspendiert und auf 80°C

15 erwärmt, wobei sich das Polysaccharid auflöst. Die Lösung wird auf

Raumtemperatur abgekühlt und 0,5 g NaOH gelöst in 20 ml Wasser zugesetzt. Anschließend werden 0,0925 mol QUAB<sup>®</sup>151 unter Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h bei 60°C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird das Gemisch mit 0,1 n HCl neutralisiert, anschließend dialysiert und gefriergetrocknet.

Die Ausbeute beträgt 99% (bezogen auf den erreichten DS).

Elementaranalyse: N % 3,22

Durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS<sub>N</sub>) = 0,57

10 Tab. 4: Homogene Kationisierung

Reagenz		Substitutionsgrad		
Polysaccharid	Typ	Molverhältnis	Produkt	
AGU : Reagenz				
Hylon	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 3	H 5 (436)	0,55
Kartoffelstärke	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	P 5 (KS 9)	0,42
Amioca	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	WM 5 (504)	0,57
Weizenstärke	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	W 5 (531)	0,41
Maisstärke	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	M 5 (532)	0,40
Sölamyl	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1	S 4 (588)	0,60

#### 4. Kationisierung in mehreren Stufen

5 g kationisiertes Polysaccharid (Art des Polysaccharides, siehe folgende Tabelle 5) werden in einer NatronlaugeLösung (0,5 g NaOH in 100 ml Wasser) suspendiert. Das Gemisch wird für eine Stunde bei 60°C gerührt. Bei dieser

12

Temperatur werden 0,2 mol QUAB<sup>®</sup>151 zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 6 h bei 60°C gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird das Gemisch mit 0,1 n HCl neutralisiert; anschließend dialysiert und gefriergetrocknet.

5 Die Ausbeute beträgt 95% (bezogen auf den erreichten DS).

Elementaranalyse: N % 5,11

Durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS<sub>N</sub>) = 1,32

Tab. 5: Kationisierung in mehreren Stufen

Kationisierte Stärke		Reagenz		Substit. Grad	
Polysac- charid	Ausgangs- DS	Typ	Molverh. AGU:Reag.	Produkt	DS <sub>N</sub>
Hylon	0,40	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 2	H 6 (479)	0,90
Hylon	0,80	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 1,5	H 7 (498)	1,10
Kartoffel	0,77	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 2	P 6 (506)	1,18
Kartoffel	0,42	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 10	P 7 (597)	1,32
Amioca	0,60	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 10	WM 6 (598)	1,25
Weizen	0,41	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 10	W 6 (603)	1,16
Weizen	0,88	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 10	W 7 (602)	1,41
Mais	0,55	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 10	M 6 (600)	1,13
Kartoffel	1,32	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 15	P 8	1,80
Mais	1,13	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 10	M 7	1,65
Solamyl	0,80	QUAB <sup>®</sup> 151	1 : 2	S 5 (610)	0,91

#### 5. Bestimmung der antibakteriellen/antimikrobiellen Aktivität der Verbindungen gegen grampositive und gramnegative Bakterien und gegen Hefen.

Die antibakterielle Aktivität der Verbindungen gegen Staphylococcus aureus SG 511, S. aureus 134/93 (multiresistent) und Mycobacterium vaccae IMET 10670 wurde mittels Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) in einem

20

13

Mikro-Bouillon-Verdünnungstest in Müller-Hinton Bouillon (DIFCO) entsprechend der NCCLS-Richtlinien [National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 4<sup>th</sup> Ed.; Villanova, Ed.; Approved standard Document M7-A4; NCCLS, (1997)] geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Antibakterielle Aktivität

Probe	Substitutions- grad DS <sub>N</sub>	MHK [mg/L]		
		Staphylococcus aureus		Mycobacterium vaccae
		SG 511	134/93	IMET10670
H 4 KS006	0,92	15,6	15,6	7,8
H 7 498	1,10	15,6	15,6	7,8
WM 4 502	0,92	31,25	62,5	15,6
M 3 519	0,72	15,6	62,5	7,8
M 4 515	1,03	31,25	62,5	15,6
P 3 016	0,69	31,25	62,5	7,8
P 4 013	1,05	15,6	125	3,9
W 2 567	0,57	62,5	62,5	15,6
W 3 571	0,61	31,25	31,25	7,8
W 1527	0,99	31,25	31,25	15,6
S 1 554	0,68	31,25	62,6	15,6
S 2 555	0,76	15,6	31,25	7,8
S 3 568	0,80	15,6	15,6	7,8

10

#### 6. Bestimmung der antiviralen Wirkung gegenüber Herpes simplex Virus Typ 1

Vor den antiviralen Untersuchungen wurde die 50 %ig zytotoxische Konzentration (CC<sub>50</sub>) in Green monkey kidney (GMK) Zellen bestimmt, um unspezifische Substanzwirkungen ausschließen zu können. Dazu werden geschlossene GMK-Zellrasen in Mikrotiterplatten mit den entsprechenden

15



Substanzverdünnungs-reihen (Faktor <sup>14</sup> 2) beimpft (Schmidtke et al.; J. Virol. Meth. **95**, 2001, 133). Nach einer 72-stündigen Inkubation erfolgt die Färbung der Zellen mit Kristallviolett/Methanol. Nach dem Herauslösen des Farbstoffes wird die optische Dichte der einzelnen Vertiefungen in einem Plattenphotometer der Firma Dynatech (550/630 nm) gemessen und mit dem Mittelwert von 6 unbehandelten Zellkontrollen verglichen, der als 100 % angenommen wird. Die CC<sub>50</sub> stellt die Substanzkonzentration im Schnittpunkt der Extinktionskurve der Verdünnungsreihe mit der 50 % Linie des Kontrollmittelwertes dar. Die antivirale Wirkung der Verbindungen gegenüber HSV-1 wurde im zytopathischen Effekt-Hemmtest (zpE-Hemmtest) in GMK-Zellen untersucht und die 50 %ige Hemmdosis (IC<sub>50</sub>) ermittelt (Schmidtke et al.; J. Virol. Meth. **95**, 2001, 133). Der Selektionsindex wurde als Quotient aus CC<sub>50</sub> und IC<sub>50</sub> berechnet (Tabelle 7). Die Ausgangsverbindungen (QUAB-Reagenzien bzw. nichtmodifizierte Stärken) zeigten keine antivirale Wirkung (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tab. 7: Antivirale Aktivität

Probe	Substitutions- grad DS <sub>N</sub>	CC <sub>50</sub> (µg/ml) in GMK-Zellen	IC <sub>50</sub> (µg/ml) gegenüber HSV-1	Selektionsindex (CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
H 3 477	0,40	>200	8,54	> 23,42
H 1 466	0,50	>200	5,11	> 39,14
H 2 005	0,66	> 200	7,07	> 28,29
WM 2 503	0,38	> 200	7,05	> 28,37
M 1 517	0,35	> 200	7,84	> 25,51
P 1 491	0,34	> 200	10,15	> 19,70
W 4 520	0,39	> 200	10,55	> 18,96
S 1 554	0,68	141,54	3,59	39,43

### 7. Bestimmung der Wirkungsweise im modifizierten PRT

Die Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Substanz wurden mit dem Acyclovir- und Phosphonoameisensäure-sensitivem HSV1 Stamm Kupka in einem modifiziertem PRT beispielhaft mit der Verbindung M 1 durchgeführt (Schmidtke et al.; J. Virol. Meth. **95**, 2001, 133). Hierbei erfolgte die Substanzzugabe in verschiedenen Konzentrationen:

1. nur zu zellfreiem Virus ( $10^6$  pfu/ml), welches dann mit der Verbindung für 6h bei 37°C inkubiert und nach Ausverdünnen der Substanz in den PRT einbezogen wurde: keine Plaquereduktion im Dosisbereich bis 6,25-25 µg/ml (Ergebnisse nicht dargestellt),
2. nur im Agar: keine Plaquereduktion im Dosisbereich 6,25-25 µg/ml (Ergebnisse nicht dargestellt),
3. nur während der einstündigen Adsorption für 2 h bei 4°C (3,12-12,5 µg/ml) und
4. 1, 2 und 4 h vor Viruszugabe (3,12-12,5 µg/ml).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigen, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen nicht viruzid wirken, denn eine Inaktivierung von zellfreiem Virus konnte nicht festgestellt werden. Voraussetzung für die Hemmung der Herpesvirusreplikation ist vielmehr die Anwesenheit der Substanz vor bzw. während der Virusadsorption an die Testzellen.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**